

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.  
Vol. 18, 1980, pp. 901–908

## Der Einfluß von Insulin auf den Stoffwechsel von isolierten Glomerula der Ratte<sup>1)</sup>

Von J. Oldendorf und H. Reinauer

*Lehrstuhl für klinische Biochemie und biochemische Abteilung des Diabetes-Forschungsinstituts an der Universität Düsseldorf*

(Eingegangen am 7. Dezember 1979/14. Mai 1980)

**Zusammenfassung:** Isolierte Glomerula wurden aus den Nieren von stoffwechselgesunden und diabetischen Ratten gewonnen und ihre Morphologie und ihre metabolische Leistungsfähigkeit untersucht. Der DNA- und Proteingehalt der isolierten Glomerula war bei chronisch diabetischen Tieren signifikant erhöht und die DNA/Protein-Relation verändert. Diese Änderungen konnten durch Insulinbehandlung der diabetischen Ratten in vivo verhindert werden. Insulin hatte keinen Einfluß auf den Abbau von Glucose in den Glomerula von normalen und diabetischen Ratten. Die Proteinsynthese ist in den Glomerula von akut diabetischen Ratten unverändert, steigt jedoch im chronischen Diabetes signifikant an. Die RNA-Synthese hingegen ist im akuten Diabetes auf ein Drittel vermindert, steigt aber bei chronischem Diabetes ebenfalls signifikant an. Während in den Glomerula von Normaltieren sowohl die Proteinsynthese als auch die RNA-Synthese durch Insulinzugabe in vitro gesteigert werden kann, fehlt dieser Effekt in den Glomerula von diabetischen Ratten. Eine Insulinresistenz in vitro ist somit festzustellen. Nur die Insulinsubstitution in vivo verhindert die Änderungen der Protein- und RNA-Synthese. Der Einbau von Lysin und Uridin war in den Glomerula von Normaltieren zusätzlich abhängig von der Glucosekonzentration.

Aus den Untersuchungen wird gefolgert, daß unter Insulinmangel und erhöhter Blutzuckerkonzentration charakteristische Veränderungen des Protein- und RNA-Stoffwechsels auftreten, die auf die morphologisch und biochemisch faßbaren Strukturveränderungen bezogen werden können.

### *The effect of insulin on the metabolism of isolated rat glomeruli*

**Summary:** Glomeruli isolated from the kidneys of metabolically normal and diabetic rats were investigated morphologically and metabolically. Glomeruli from chronically diabetic animals showed significantly increased contents of DNA and protein, and an altered DNA/protein ratio. These changes were prevented by insulin treatment in vivo of diabetic rats. Insulin had no effect on glucose degradation by the glomeruli of normal or diabetic rats. Protein synthesis is unchanged in the glomeruli from acutely diabetic rats, but shows a significant increase in those from chronically diabetic animals. In the glomeruli of normal animals, both protein synthesis and RNA synthesis are increased in vitro by insulin, but this effect is absent from the glomeruli of diabetic rats. Under in vitro conditions there is a resistance to insulin. Changes in protein and RNA synthesis can be prevented by insulin only when it is administered in vivo. In addition, the incorporation of lysine and uridine in the glomeruli of normal animals was dependent on the glucose concentration.

It is concluded from these results that insulin deficiency and increased blood sugar level are accompanied by characteristic changes in the metabolism of protein and RNA, which are related to morphologically and biochemically detectable structural changes.

### **Einführung**

Die diabetische Glomerulosklerose ist morphologisch charakterisiert durch eine diffuse Verdickung der Basalmembran, durch Vergrößerung der Glomerula und Ver-

mehrung des Mesangiums mit terminaler Hyalinisierung. Die Basalmembranverdickung wurde nicht nur beim Menschen, sondern auch bei Versuchstieren mit chemisch induziertem (1–2) oder genetischem Diabetes (3) nachgewiesen.

Über die metabolischen Ursachen der genannten Basalmembranveränderungen in den Glomerula gibt es nur

<sup>1)</sup> Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Paul-Kuth-Stiftung durchgeführt.

Hypothesen. Die Frage, ob die Synthese der Basalmembranproteine quantitativ verändert und/oder ihr Abbau vermindert sind, wurde noch nicht schlüssig geklärt.

Bisher wurden vorwiegend Befunde an einzelnen Enzymen, an der Proteinsynthese und anderen Stoffwechselgrößen erhoben und zur Erklärung der diabetischen Glomerulosklerose herangezogen.

So wurde eine erhöhte Aktivität der Lysin-Hydroxylase (EC 1.14.11.4) und der UDP-Glucose-Transferase im Diabetes gefunden (4–9).

Eine Erhöhung der Proteinsynthese in Mikrosomen- bzw. Ribosomenpräparationen aus der Nierenrinde von diabetischen Versuchstieren und eine deutlich erhöhte Kollagensynthese wurden gemessen (10–11). Der erhöhte Lysin-Einbau, die erhöhte Hydroxylysin-Synthese und das zugunsten des Hydroxylysin verschobene Lysin/Hydroxylysin-Verhältnis in isolierten Glomerula und die Normalisierung durch die Insulintherapie ergänzen diese Befunde (12). Dementsprechend war die Aktivität der Prolin-Hydroxylase (EC 1.14.11.2) und der Lysin-Hydroxylase in der Nierenrinde von Streptozotocin-diabetischen Ratten erhöht (8).

Widersprüchliche Befunde liegen über die quantitative Aminosäurezusammensetzung der glomerulären Basalmembran vor (13–17).

Auch der Einfluß von Insulin *in vitro* auf die Oxidation und den Einbau von Glucose in isolierten Glomerula von Alloxan-diabetischen Tieren wurde untersucht. Insulin hatte keinen Effekt, jedoch wurden sowohl die Oxidation als auch der Einbau von Glucose in Glomerula von normalen und diabetischen Tieren durch Erhöhung der Glucosekonzentration im Inkubationsmedium gesteigert (18–19). Ein Teil der sich widersprechenden Ergebnisse wurde an der ganzen Niere oder der Nierenrinde erhoben. Bei diesen Untersuchungen überwiegt aber das tubuläre Zellsystem, so daß diese Ergebnisse nur eine geringe Aussagekraft für glomeruläre Stoffwechselveränderungen besitzen. Einigkeit besteht auch darüber, daß Enzymaktivitätsmessungen im Gewebshomogenat unter optimierten Bedingungen die aktuellen Gegebenheiten im Stoffwechsel und den tatsächlichen Substratumsatz nicht wiedergeben können.

Aus den genannten Gründen wurde der Stoffwechsel des Zellsystems der isolierten Glomerula von normalen und diabetischen Ratten verglichen. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden der Kohlenhydrat-, Protein- und Ribonucleinsäurestoffwechsel unter Berücksichtigung der Insulinsensitivität untersucht.

## Material und Methoden

Männliche Wistar-Ratten (250–300 g) wurden nach 20 Stunden Hunger mit Äther narkotisiert, die Nieren wurden entfernt, dekapuliert und halbiert. Die Isolation der Glomerula erfolgte in Anlehnung an die Siebmethode von *Krakower & Greenspon* (20). Die Nierenhälften wurden durch ein Stahlsieb mit 280 µm Ma-

schensweite gerieben. Anschließend wurde mit eiskaltem Medium TC 199 (Serva Feinbiochemica, Heidelberg: TC Medium 199 mit *Earle's* Salzen ohne Glucose, L-Lysin, ATP, Natriumacetat und Tween 80) nachgespült. Zur Abtrennung grober Gewebsbestandteile wurde der Gewebebrei durch ein Kunststoffnetz von 180 µm Maschenweite gegossen und die Glomerula dann auf einem weiteren Kunststoffnetz von 100 µm Maschenweite aufgefangen und in eiskaltem Medium TC 199 suspendiert. Zur höheren Konzentrierung der Glomerulumsuspension folgte eine Sedimentation von 30 Minuten im Eisbad mit anschließendem Absaugen des Überstandes. Danach wurden die Glomerula sofort zur Inkubation verwendet. Die Ausbeute betrug etwa 10 000 Glomerula pro Niere. Die Verunreinigung durch Tubulusfragmente lag bei durchschnittlich 2%. Etwa 20% der Glomerula besaßen noch eine intakte *Bowman's* Kapsel. Die Vitalitätsprüfung erfolgte durch Anfärbung mit Trypanblau, durch Licht- und Elektronenmikroskopie (Abb. 1) und aufgrund metabolischer Parameter.

### Erzeugung des Diabetes (Tab. 1)

Der *akute Diabetes* wurde durch eine Streptozotocin-Injektion von 80 mg/kg Körpergewicht intravenös erzeugt und der Glomerulumstoffwechsel nach einer Diabetesdauer von 3 Tagen untersucht. Der Blutzucker lag über 350 mg/dl. Es bestand eine massive Glucosurie mit Ketonurie.

Für den *chronischen Diabetes* erhielten die Tiere eine intraperitoneale Streptozotocin-Injektion von 80 mg/kg Körpergewicht und wurden nach einer Diabetesdauer von 4 Wochen untersucht.

Eine Gruppe dieser chronisch diabetischen Tiere erhielt täglich Insulin (10 U/kg Körpergewicht) über die gesamte Versuchsdauer (*chronischer Diabetes mit Dauertherapie*). Der Blutzuckerspiegel betrug nüchtern 100 mg/dl. Es bestand eine leichte Glucosurie ohne Ketonurie.

Eine weitere Gruppe (*chronischer Diabetes mit Teiltherapie*) erhielt das Insulin erst nach einem therapiefreien Intervall von 14 Tagen. Dabei lagen die Blutzuckernüchternwerte am Ende der Versuchsdauer bei 110 mg/dl.

In der dritten Gruppe wurde kein Insulin appliziert. Diese Gruppe erreichte durchschnittliche Blutzuckerwerte von 480 mg/dl und eine massive Glucosurie und Ketonurie (*chronischer Diabetes*).

Zur Bestimmung der Oxidationsrate wurde das produzierte  $^{14}\text{CO}_2$  durch Hyamine® absorbiert und im Flüssigkeitsszintillationszähler gezählt.

### Oxidation von Glucose:

Endkonzentration von Glucose: 10 mmol/l

Spezifische Radioaktivität von  $[\text{U-}^{14}\text{C}]\text{Glucose}$ : 37 GBq/mol

### Oxidation und Einbau von Glucuronat:

Endkonzentration von Glucuronat: 5 mmol/l

Spezifische Radioaktivität von  $[\text{U-}^{14}\text{C}]\text{Glucuronat}$ : 37 GBq/mol

### Oxidation und Einbau von Xylit:

Endkonzentration von Xylit: 5 mmol/l

Spezifische Radioaktivität von  $[\text{U-}^{14}\text{C}]\text{Xylit}$ : 37 GBq/mol

Bei der Bestimmung der Einbaurate wurde das Sediment nach Säurefällung dreimal gewaschen, in Hyamine® im Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt.

### Einbau von Lysin:

Endkonzentration von Glucose: 10 mmol/l oder wie angegeben

Endkonzentration von Lysin: 500 µmol/l

Spezifische Radioaktivität von  $[\text{U-}^{14}\text{C}]\text{Lysin}$ : 370 GBq/mol

### Einbau von Uridin:

Endkonzentration von Glucose: 10 mmol/l oder wie angegeben

Endkonzentration von Uridin: 4 µmol/l

Spezifische Radioaktivität von  $[\text{U-}^{14}\text{C}]\text{Uridin}$ : 18,5 TBq/mol

Die Inkubation der Glomerula erfolgte jeweils in Dreifachansätzen bei 37 °C im Schüttelwasserbad über 60 und 120 Minuten. Das Endvolumen der Ansätze betrug 0,5 ml, die Glomerulumsuspension (2500–7000 Glomerula) wurde in einem Volumen von 0,2 ml zugegeben.



Abb. 1. Ultrastruktur der isolierten Glomerula.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung zeigt den morphologischen Erhaltungszustand des Zellsystems. Vergrößerung 6000:1.

Die Insulinsensitivität wurde durch eine Insulinendkonzentration von 50 mU/Ansatz (100 U/l) geprüft, nachdem Vorversuche einen hohen Insulinabbau ergeben hatten.

Der Proteingehalt der Glomerula wurde nach Lowry et al. (21) bestimmt. Die Bestimmung des DNA-Gehaltes erfolgte nach Burton (22).

Die statistischen Berechnungen wurden mit dem t-Test nach Student ausgeführt.

### Ergebnisse

DNA- und Proteingehalt der isolierten Glomerula waren im akuten Diabetes gegenüber den Normaltieren nicht verändert (Tab. 2). Bei den chronisch diabetischen Tieren war eine signifikante Steigerung ( $2p < 0,001$ ) des DNA- und Proteingehaltes auf das Doppelte bzw. Zweieinhalbfache festzustellen, woraus eine Verschiebung des DNA/Protein-Verhältnisses von 1:20 auf 1:25 resultierte.

Insulinsubstitution in vivo führt zur signifikanten Verringerung ( $2p < 0,001$ ) des DNA- und Proteingehaltes, ohne jedoch eine vollständige Normalisierung zu bewirken. Es fanden sich keine Unterschiede zwischen Dauer- und Teiltherapie.

Die Stoffwechselleistung der isolierten Glomerula, dargestellt an Glucose-Oxidation und Lysin-Einbau, war bei normalen und diabetischen Tieren linear in Abhängigkeit von der Zeit und der eingesetzten Gewebemenge. Die Abbildung 2 zeigt dies für die Glucose-Oxidation in Glomerula von Normaltieren.

Beim Abbau von Glucose zu  $\text{CO}_2$  waren keine Unterschiede in den isolierten Glomerula von normalen und akut diabetischen Tieren nachweisbar. Insulin in vitro

Tab. 1. Körpergewicht, Blutzuckerkonzentration, Harnzucker und Ketonurie bei chronisch diabetischen Ratten. Harnzucker und Ketonurie wurden mit Gluketur®-Test bestimmt.

	1. Woche				2. Woche				3. Woche				4. Woche			
	Kör- per- ge- wicht	Blut- zuck- er	Harn- zuck- er	Ke- ton- urie	Kör- per- ge- wicht	Blut- zuck- er	Harn- zuck- er	Ke- ton- urie	Kör- per- ge- wicht	Blut- zuck- er	Harn- zuck- er	Ke- ton- urie	Kör- per- ge- wicht	Blut- zuck- er	Harn- zuck- er	Ke- ton- urie
	(g)	(mg/dl)			(g)	(mg/dl)			(g)	(mg/dl)			(g)	(mg/dl)		
Chronischer Diabetes (n = 15)	253 ± 25	400 ± 60	+++	+	220 ± 20	450 ± 80	+++	++	200 ± 18	460 ± 80	+++	+++	190 ± 15	480 ± 100	+++	+++
Körpergewicht = 290 ± 15 g																
Chronischer Diabetes mit Teiltherapie (n = 20)	250 ± 20	410 ± 50	+++	+	230 ± 22	440 ± 80	+++	++	240 ± 25	160 ± 60	++	+	280 ± 22	110 ± 30	+++	-
Körpergewicht = 280 ± 18 g																
Chronischer Diabetes mit Dauertherapie (n = 20)	280 ± 25	180 ± 80	+	-	300 ± 20	100 ± 30	+	-	310 ± 27	100 ± 25	+	-	315 ± 30	100 ± 20	+	-
Körpergewicht = 280 ± 16 g																

Tab. 2. DNA- und Proteingehalt von isolierten Glomerula.

	DNA ( $\mu$ g/1000 Glomerula)	Protein ( $\mu$ g/1000 Glomerula)	DNA: Pro- tein
Kontrolle	8,16 ± 0,56 (n = 30)	165 ± 15 (n = 30)	1:20
Akuter Diabetes	8,16 ± 0,87 (n = 20)	165 ± 11 (n = 20)	1:20
Chronischer Diabetes	15,97 ± 1,82 (n = 10)	401 ± 25 (n = 10)	1:25
Chronischer Diabetes mit Teiltherapie	11,07 ± 0,93 (n = 10)	234 ± 32 (n = 10)	1:21
Chronischer Diabetes mit Dauertherapie	11,44 ± 0,73 (n = 10)	234 ± 18 (n = 10)	1:21

Tab. 3. Abbau zu CO<sub>2</sub>.  
Insulinkonzentration: 100 U/l

	Glucose (nmol/1000 Glomerula × h)	Glucuronat (nmol/1000 Glomerula × h)	Xylit (nmol/1000 Glomerula × h)
Kontrolle	0,71 ± 0,11 (n = 10)	0,27 ± 0,07 (n = 3)	0,11 ± 0,01 (n = 3)
Kontrolle + Insulin	0,82 ± 0,11 (n = 8)	0,27 ± 0,05 (n = 3)	0,12 ± 0,02 (n = 3)
Akuter Diabetes	0,65 ± 0,07 (n = 5)	0,26 ± 0,07 (n = 3)	0,09 ± 0,01 (n = 3)
Akuter Diabetes + Insulin	0,72 ± 0,03 (n = 5)	0,25 ± 0,05 (n = 3)	0,08 ± 0,02 (n = 3)

hatte keinen Einfluß auf die Abbaurrate von Glucose (Tab. 3).

Glucuronat und Xylit werden durch das glomeruläre Zellsystem zu CO<sub>2</sub> abgebaut (Tab. 3). Dieser Abbau ist durch

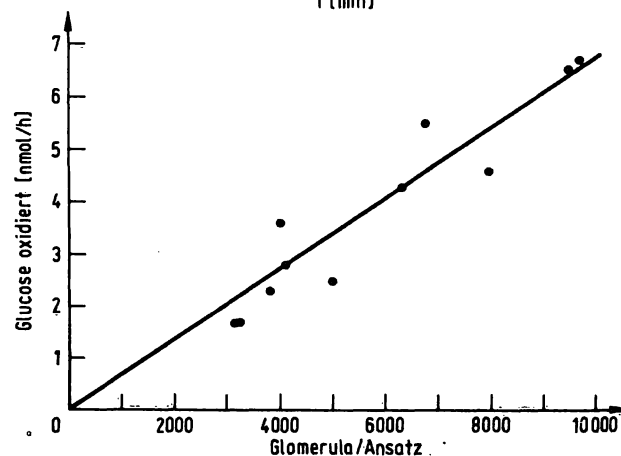
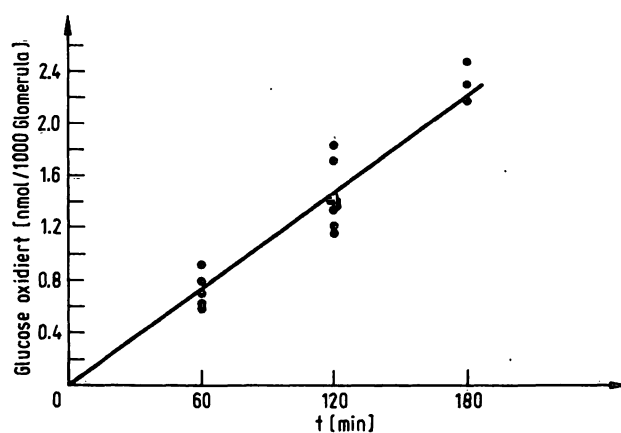


Abb. 2. Oxidation von Glucose in Abhängigkeit von der Zeit und der eingesetzten Gewebemenge durch das glomeruläre Zellsystem.

Insulin in vitro und akuten Insulinmangel in vivo nicht zu beeinflussen. Auffallend ist, daß der Abbau von Xylit nur etwa die Hälfte des Glucuronat-Abbaues beträgt.

Glucuronat wird im Gegensatz zu Xylit auch in das säurefällbare Protein eingebaut (Tab. 4). Auch dieser Einbau zeigt keine Veränderung im akuten Diabetes und läßt sich auch durch Insulin in vitro nicht beeinflussen.

Der Einbau von Lysin in das säurefällbare Protein ist in den Glomerula von stoffwechselgesunden Tieren durch Insulin in vitro signifikant ( $2p < 0,001$ ) zu steigern (Tab. 4). In den Glomerula von akut diabetischen Tieren ist dieser Effekt nicht nachweisbar: Gegenüber den Normaltieren ist der Einbau von Lysin im akuten Diabetes unverändert. Beim chronischen Diabetes ist der Lysin-Einbau bezogen auf die Zahl der Glomerula signifikant ( $2p < 0,001$ ) erhöht. Insulinbehandlung nach therapiefreiem Intervall führt zu einer weiteren Steigerung, während sich der Lysin-Einbau bei durchgehender Insulinsubstitution wieder der Kontrolle annähert (Tab. 4).

Tab. 4. Einbau von Glucuronat, Lysin und Uridin in das säurefällbare Protein.

	Glucuronat (nmol/1000 Glomerula × h)	Lysin (nmol/1000 Glomerula × h)	Uridin (Bq/1000 Glomerula × h)
Kontrolle	0,10 ± 0,02 (n = 3)	0,086 ± 0,005 (n = 8)	6,30 ± 0,13 (n = 5)
Kontrolle + Insulin	0,11 ± 0,02 <sup>1)</sup> (n = 3)	0,125 ± 0,021 <sup>3)</sup> (n = 6)	7,28 ± 0,47 <sup>4)</sup> (n = 5)
Akuter Diabetes	0,10 ± 0,01 <sup>1)</sup> (n = 3)	0,086 ± 0,006 <sup>1)</sup> (n = 5)	2,17 ± 0,25 <sup>3)</sup> (n = 5)
Akuter Diabetes + Insulin	0,10 ± 0,03 <sup>2)</sup> (n = 3)	0,095 ± 0,009 <sup>2)</sup> (n = 5)	2,13 ± 0,33 <sup>2)</sup> (n = 5)
Chronischer Diabetes	n. b.	0,105 ± 0,007 <sup>5)</sup> (n = 5)	8,37 ± 0,45 <sup>6)</sup> (n = 5)
Chronischer Diabetes mit Teiltherapie	n. b.	0,147 ± 0,022 <sup>7)</sup> (n = 5)	6,77 ± 0,95 <sup>8)</sup> (n = 5)
Chronischer Diabetes mit Dauer- therapie	n. b.	0,104 ± 0,018 <sup>9)</sup> (n = 5)	6,12 ± 0,07 <sup>10)</sup> (n = 5)

<sup>1)</sup> Nicht signifikant gegen Kontrolle.

<sup>2)</sup> Nicht signifikant gegen akuten Diabetes.

<sup>3)</sup>  $2p < 0,001$  gegen Kontrolle.

<sup>4)</sup>  $2p < 0,005$  gegen Kontrolle.

<sup>5)</sup>  $2p < 0,001$  gegen Kontrolle;  $2p < 0,005$  gegen akuten Diabetes.

<sup>6)</sup>  $2p < 0,001$  gegen Kontrolle und akuten Diabetes.

<sup>7)</sup>  $2p < 0,005$  gegen chronischen Diabetes.

<sup>8)</sup>  $2p < 0,01$  gegen chronischen Diabetes.

<sup>9)</sup> Nicht signifikant gegen chronischen Diabetes;  $2p < 0,02$  gegen Kontrolle;  $2p < 0,01$  gegen chronischen Diabetes mit Teiltherapie.

<sup>10)</sup>  $2p < 0,001$  gegen chronischen Diabetes;  $2p < 0,05$  gegen Kontrolle; Nicht signifikant gegen chronischen Diabetes mit Teiltherapie.

Die RNA-Synthese, gemessen mit Hilfe des Einbaues von Uridin, ist im akuten Diabetes auf ein Drittel der Kontrollwerte vermindert (Tab. 4). Wie beim Lysin-Einbau findet sich eine signifikante ( $2p < 0,005$ ) Steigerung durch Insulin in vitro in den Glomerula von Normaltieren, während sich dieser Effekt im akuten Diabetes nicht nachweisen läßt. Chronisch diabetische Tiere weisen einen signifikant ( $2p < 0,001$ ) erhöhten Uridin-Einbau der isolierten Glomerula auf, der durch die Insulinbehandlung wieder den Kontrollwerten angenähert wird (Tab. 4).

Der Einbau von Lysin und Uridin war in den Glomerula von Normaltieren abhängig von der Glucosekonzentration bis zu 10 mmol/l (Tab. 5). Dabei waren die Einbau-raten bei einer Glucosekonzentration von 10 mmol/l jeweils signifikant verschieden von den Einbau-raten bei niedrigeren Glucosekonzentrationen.

## Diskussion

Bei Untersuchungen an isolierten Zellsystemen ist neben der Einheitlichkeit des Systems die Integrität und Vitalität der Zellen nach morphologischen und metabolischen Kriterien zu beachten. Bei der hier verwendeten Dissoziation des Gewebes wurde im Gegensatz zu anderen Untersuchungen auf die Zentrifugation zur Anreicherung der Glomerula verzichtet, weil sich bereits in den Vorversuchen herausstellte, daß wiederholte Zentrifugation das glomeruläre Zellsystem schädigt. Durch die einfache Sedimentation in der Kälte verringerte sich der Anteil der trypanblaugefärbten Glomerula auf 5%.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung bestätigte den guten Erhaltungszustand des Zellsystems. Auch die metabolischen Parameter, z. B. Glucose-Oxidation und Lysin-Einbau, zeigten Linearität in Abhängigkeit von der Zeit und der eingesetzten Gewebemenge.

In Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen (23), die eine Vergrößerung und einen vermehrten Kollagengehalt

Tab. 5. Abhängigkeit des Lysin- und Uridineinbaues von der Glucosekonzentration des Inkubationsmediums.

Glucose (mmol/l)	Lysin (nmol/1000 Glomerula × h)	Uridin (Bq/1000 Glomerula × h)
2	0,065 ± 0,006 (n = 5)	5,43 ± 0,55 (n = 5)
5	0,071 ± 0,004 <sup>1)</sup> (n = 5)	5,37 ± 0,28 <sup>1)</sup> (n = 5)
10	0,086 ± 0,005 <sup>2)</sup> (n = 8)	6,30 ± 0,13 <sup>3)</sup> (n = 5)

<sup>1)</sup> Nicht signifikant gegen 2 mmol/l Glucose.

<sup>2)</sup>  $2p < 0,001$  gegen 2 mmol/l und 5 mmol/l Glucose.

<sup>3)</sup>  $2p < 0,01$  gegen 2 mmol/l Glucose und  $2p < 0,001$  gegen 5 mmol/l Glucose.

der Glomerula im Diabetes fanden, ergaben unsere Untersuchungen eine Verdoppelung des DNA-Gehaltes und eine darüber hinausgehende Vermehrung des Proteingehaltes der isolierten Glomerula im chronischen Diabetes, während im akuten Diabetes noch keine Veränderungen des DNA- bzw. Proteingehaltes gegenüber den Kontrollen nachzuweisen waren.

Die auf Befunden an Autopsie-Nieren beruhende These, daß es sich bei der Vergrößerung der Glomerula um eine kompensatorische Hypertrophie zum Ersatz zerstörter Glomerula handeln könnte (24), wird durch die schnelle Normalisierung des DNA- und Proteingehaltes unter der Insulintherapie bei den chronisch diabetischen Tieren in Frage gestellt. Wenn ein Teil der Glomerula wegen einer Verlegung der Kapillarschlingen funktionell nicht mehr aktiv wäre, dann müßte die kompensatorische Hypertrophie auch unter der Insulintherapie zum Erhalt der Nierenfunktion weiter bestehen bleiben.

Der Rückgang des DNA- und Proteingehaltes auch unter der verzögerten Therapie nach therapiefreiem Intervall zeigt, daß eine vermehrte Zellinfiltration als einzige Ursache der erhöhten DNA- und Proteingehalte ausscheidet. Vielmehr sind die genannten Veränderungen insulinabhängig und müssen auf die Hyperglykämie, die Glucosurie, die Proteinurie und/oder den Insulinmangel zurückgeführt werden.

Die erhobenen Befunde veranlassen erneut zu kritischen Überlegungen bezüglich des „richtigen“ Bezugssystems. Bezieht man die gefundenen Einbauraten von Lysin und Uridin auf die Zahl der eingesetzten Glomerula, so werden die Befunde von *Cohen & Khalifa* (12) über die gesteigerte Proteinsynthese in isolierten Glomerula im Dia-

betes bestätigt und lassen sich auch für die RNA-Synthese nachweisen. Berücksichtigt man jedoch die Verdoppelung des DNA-Gehaltes und die Vermehrung des Proteingehaltes auf das Zweieinhalbfache, so ergibt sich eine Verringerung der Einbauraten von Lysin und Uridin bezogen auf diese Parameter (Tab. 6 und 7). Daraus ist zu folgern, daß vermehrt Strukturproteine abgelagert worden sind, was dem morphologischen Korrelat der Basalmembranverdickung entsprechen könnte. Der Bezug der metabolischen Zelleistung auf das Gesamtprotein oder das Trockengewicht erscheint daher problematisch.

Auch die Bezugsgröße DNA ist angesichts der beschriebenen Zellvermehrungen in den Glomerula in Frage gestellt. Daher wurden unsere Befunde auf die Zahl der eingesetzten Glomerula bezogen.

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, daß im kollagenähnlichen Basalmembranprotein verhältnismäßig viel Lysin enthalten ist (13–17). Da aber gerade die Basalmembranveränderungen im Mittelpunkt des Interesses stehen, ist die Messung des Lysin-Einbaues in das säurefällbare Protein ein geeigneter Parameter zur Messung der Protein- und speziell der Basalmembransynthese.

Während unsere Untersuchungen in Übereinstimmung mit den Befunden von *Wahl et al.* (18–19) keinen Insulin-Effekt auf die Glucose-Oxidation in isolierten Glomerula ergaben, zeigen die Ergebnisse der Lysin- und Uridin-Einbauversuche, daß der Stoffwechsel des glomerulären Zellsystems insulin sensitiv ist. Dies gilt sowohl für die Insulinzugabe *in vitro* als auch *in vivo*.

Insulin *in vitro* steigert den Einbau von Lysin und Uridin in das säurefällbare Protein in Glomerula von Normal-

Tab. 6. Einbau von Lysin bezogen auf die Zahl der Glomerula, den DNA- und Proteingehalt der Glomerula.

	Lysin (nmol/1000 Glomerula × h)	Lysin (nmol/10 µg DNA × h)	Lysin (nmol/100 µg Protein × h)
Kontrolle	0,086 ± 0,005 (n = 8)	0,105 ± 0,006 (n = 8)	0,052 ± 0,003 (n = 8)
Akuter Diabetes	0,086 ± 0,006 (n = 5)	0,105 ± 0,007 (n = 5)	0,052 ± 0,003 (n = 5)
Chronischer Diabetes	0,105 ± 0,007 <sup>1)</sup> (n = 5)	0,066 ± 0,004 <sup>2)</sup> (n = 5)	0,026 ± 0,002 <sup>2)</sup> (n = 5)
Chronischer Diabetes mit Teiltherapie	0,147 ± 0,022 <sup>3)</sup> (n = 5)	0,133 ± 0,020 <sup>4)</sup> (n = 5)	0,063 ± 0,009 <sup>5)</sup> (n = 5)
Chronischer Diabetes mit Dauertherapie	0,104 ± 0,018 <sup>6)</sup> (n = 5)	0,091 ± 0,016 <sup>7)</sup> (n = 5)	0,044 ± 0,008 <sup>8)</sup> (n = 5)

- 1) 2p < 0,001 gegen Kontrolle.  
2p < 0,005 gegen akuten Diabetes.
- 2) 2p < 0,001 gegen Kontrolle und akuten Diabetes.
- 3) 2p < 0,005 gegen chronischen Diabetes.  
2p < 0,001 gegen Kontrolle.
- 4) 2p < 0,001 gegen chronischen Diabetes.  
2p < 0,005 gegen Kontrolle.
- 5) 2p < 0,001 gegen chronischen Diabetes.  
2p < 0,01 gegen Kontrolle.

- 6) Nicht signifikant gegen chronischen Diabetes.  
2p < 0,02 gegen Kontrolle.  
2p < 0,01 gegen chronischen Diabetes mit Teiltherapie.
- 7) 2p < 0,001 gegen chronischen Diabetes.  
2p < 0,05 gegen Kontrolle.
- 8) 2p < 0,01 gegen chronischen Diabetes mit Teiltherapie.  
2p < 0,005 gegen chronischen Diabetes.  
2p < 0,025 gegen Kontrolle.  
2p < 0,01 gegen chronischen Diabetes mit Teiltherapie.

Tab. 7. Einbau von Uridin, bezogen auf die Zahl, den DNA- und Proteingehalt der Glomerula.

	[U- <sup>14</sup> C] Uridin (Bq/1000 Glomerula × h)	[U- <sup>14</sup> C] Uridin (Bq/10 µg DNA × h)	[U- <sup>14</sup> C] Uridin (Bq/100 µg Protein × h)
Kontrolle	6,30 ± 0,13 (n = 5)	7,72 ± 0,17 (n = 5)	3,82 ± 0,08 (n = 5)
Akuter Diabetes	2,17 ± 0,25 <sup>1)</sup> (n = 5)	2,65 ± 0,30 <sup>1)</sup> (n = 5)	1,32 ± 0,15 <sup>1)</sup> (n = 5)
Chronischer Diabetes	8,37 ± 0,45 <sup>2)</sup> (n = 5)	5,23 ± 0,28 <sup>2)</sup> (n = 5)	2,08 ± 0,12 <sup>2)</sup> (n = 5)
Chronischer Diabetes mit Teiltherapie	6,77 ± 0,95 <sup>3)</sup> (n = 5)	6,10 ± 0,85 <sup>4)</sup> (n = 5)	2,88 ± 0,40 <sup>5)</sup> (n = 5)
Chronischer Diabetes mit Dauertherapie	6,12 ± 0,07 <sup>6)</sup> (n = 5)	5,33 ± 0,07 <sup>7)</sup> (n = 5)	2,62 ± 0,03 <sup>8)</sup> (n = 5)

<sup>1)</sup> 2p < 0,001 gegen Kontrolle.

<sup>2)</sup> 2p < 0,001 gegen Kontrolle und akuten Diabetes.

<sup>3)</sup> 2p < 0,01 gegen chronischen Diabetes.

Nicht signifikant gegen Kontrolle.

<sup>4)</sup> Nicht signifikant gegen chronischen Diabetes.

2p < 0,005 gegen Kontrolle.

<sup>5)</sup> 2p < 0,005 gegen chronischen Diabetes.

2p < 0,001 gegen Kontrolle.

<sup>6)</sup> 2p < 0,001 gegen chronischen Diabetes.

Nicht signifikant gegen chronischen Diabetes mit Teiltherapie.

2p < 0,05 gegen Kontrolle.

<sup>7)</sup> Nicht signifikant gegen chronischen Diabetes.

Nicht signifikant gegen chronischen Diabetes mit Teiltherapie.

2p < 0,001 gegen Kontrolle.

<sup>8)</sup> 2p < 0,001 gegen chronischen Diabetes.

Nicht signifikant gegen chronischen Diabetes mit Teiltherapie.

2p < 0,001 gegen Kontrolle.

tieren. Glomerula von akut diabetischen Tieren zeigen diesen Insulin-Effekt nicht, d.h. es besteht „Insulinresistenz“.

Insulin in vivo führt die erhöhten Einbauraten von Lysin und Uridin in den Normalbereich zurück. Die höheren Einbauwerte für Lysin beim chronischen Diabetes mit Teiltherapie, verglichen mit dem chronischen Diabetes ohne Therapie, beruhen möglicherweise auf einer verminderten metabolischen Leistungsfähigkeit zur Proteinsyn-

these der glomerulären Zellen im chronischen Diabetes, so daß dort nur ein Teil der eingesetzten Zellen die volle Stoffwechselaktivität hatte.

Als einziger der von uns untersuchten Stoffwechselparameter ist die Uridin-Einbaurate bereits im akuten Diabetes verändert, und zwar auf ein Drittel der Kontrollwerte herabgesetzt. Als Erklärung könnte einmal eine allgemein toxische oder direkt depressive Wirkung des Streptozotocins auf die RNA-Synthese angenommen werden, oder aber es handelt sich um eine Wirkung des akuten Insulinmangels. Denn nach einer Adaptationszeit lassen sich unter chronischem Insulinmangel erhöhte Einbauraten für das Uridin und damit eine erhöhte RNA-Synthese, bezogen auf die Zahl der eingesetzten Glomerula, nachweisen.

Die erhöhte Protein- und RNA-Synthese und die Normalisierung durch Insulin konnte bisher nur am glomerulären Zellsystem nachgewiesen werden (12). An anderen Zellsystemen zeigt Insulin einen proteinanabolen Effekt. Dem Insulinmangel könnte daher bei der Entwicklung der diabetischen Mikroangiopathie eine pathogenetische Bedeutung zukommen.

An den isolierten Glomerula hatte nicht nur Insulin einen Stoffwechseleffekt. Wahl et al. (19) konnten zeigen, daß die Oxidation und der Einbau von Glucose durch die Erhöhung der Glucosekonzentration im Inkubationsmedium gesteigert werden. Unsere Untersuchungen ergaben, daß auch der Lysin- und der Uridin-Einbau durch die Erhöhung der Glucosekonzentration in vitro gesteigert werden können.

Beim Glucose-Einbau in die Basalmembran wird zu klären sein, ob ein aktiver Einbau von Glucose oder eines Metaboliten erfolgt oder ob eine nichtenzymatische Glucosidierung der Basalmembranproteine abläuft. Die erhöhte Glucosidierung von Proteinen im Diabetes ist bekannt (25–26) und könnte auch bei der Entstehung der diabetischen Mikroangiopathie von Bedeutung sein. Neben dem Insulinmangel kommt somit nach unseren Ergebnissen wahrscheinlich auch der Hyperglykämie eine wichtige Rolle in der komplexen Pathogenese der diabetischen Mikroangiopathie der Niere zu.

## Literatur

1. Østerby Hansen, R., Lundbaek, K., Steen Olsen, T. & Ørskov, H. (1967), *Lab. Invest.* 17, 675–692.
2. Cameron, D. P., Amherdt, M., Leunberger, P., Orci, L. & Stauffacher, W. (1973), in: *Early Diabetes* (Camerini-Davalos, R. A. & Cole, H. S. eds.) Academic Press, New York/London, 257–269.
3. Like, A. A., Lavine, R. L., Poffenbarger, L. & Chick, W. L. (1972), *Am. J. Pathol.* 66, 193–224.
4. Spiro, R. G. & Spiro M. J. (1971), *Diabetes* 20, 641–648.
5. Velasco, C., Oppermann, W., Marine, N. & Camerini-Davalos, R. A. (1974), *Horm. Metab. Res.* 6, 427.
6. Khalifa, A. & Cohen, M. P. (1975), *Biochim. Biophys. Acta* 386, 332–339.
7. Cohen, M. P. & Khalifa, A. (1977), *Biochim. Biophys. Acta* 496, 88–94.
8. Grant, M. E., Harwood, R. & Williams, I. F. (1976), *J. Physiol.* 257, 56 P–57 P.
9. Risteli, R., Koivisto, V. A., Akerblom, H. K. & Kivirikko, K. I. (1976), *Diabetes* 25, 1066–1070.
10. Peterson, D. T., Greene, W. C. & Reaven G. M. (1971), *Diabetes* 20, 649–654.
11. Cohen, M. P. & Vogt, C. A. (1975), *Horm. Metab. Res.* 7, 338–342.
12. Cohen, M. P. & Khalifa, A. (1978), *Biochim. Biophys. Acta* 500, 395–404.
13. Beisswenger, P. J. & Spiro, R. G. (1973), *Diabetes* 22, 180–193.
14. Westberg, N. G. & Michael, A. F. (1973), *Acta Med. Scand.* 194, 39–47.
15. Kefalides, N. A. (1974), *J. Clin. Invest.* 53, 403–407.

16. Sato, T., Munakata, H., Yoshinaga, K. & Yosizawa, Z. (1975), *Clin. Chim. Acta* 61, 145–150.
17. Beisswenger, P. J. (1976), *J. Clin. Invest.* 58, 844–852.
18. Wahl, P., Krezdorn, W. & Deppermann, D. (1970), *Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med.* 76, 393–396.
19. Wahl, P., Deppermann, D., Deschner, W., Fuchs, E. & Rexroth, W. (1973), in: *Early Diabetes* (Camerini-Davalos, R. A. & Cole, H. S. eds.) Academic Press, New York/London, 147–153.
20. Krakower, C. A. & Greenspon, S. A. (1951), *Arch. Pathol.* 51, 629–639.
21. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951), *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
22. Burton, K. (1956), *Biochem. J.* 62, 315–323.
23. Klein, L., Butcher, D. L., Sudilovsky, O., Kikkawa, R. & Miller, M. (1975), *Diabetes* 24, 1057–1065.
24. Gundersen, H. J. G. & Osterby, R. (1977), *Diabetologia* 13, 43–48.
25. Kennedy, A. L., Kandell, T. W. & Merimée, T. J. (1979), *Diabetes* 28, 1006–1010.
26. McFarland, K. F., Catalano, E. W., Day, J. F., Thorpe, S. R. & Baynes, J. W. (1979), *Diabetes* 28, 1011–1014.

Prof. Dr. med. H. Reinauer  
Lehrstuhl für klin. Biochemie  
der Universität Düsseldorf  
Auf'm Hennekamp 65  
4000 Düsseldorf 1